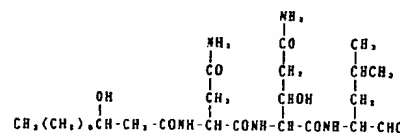


(54) PROMOTER FOR PRODUCTION OF NEURO GROWTH FACTOR AND ITS PRODUCTION

(11) 5-284992 (A) (43) 2.11.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-119532 (22) 14.4.1992
 (71) SAGAMI CHEM RES CENTER (72) TOMOKO TSUJI(2)
 (51) Int. Cl.⁵. C12P21/02, A61K37/02//A61K37/24, C07K5/06(C12P21/02, C12R1/80)

PURPOSE: To obtain the subject promoter useful for preventing and treating dementia, disorder of peripheral nerve, etc., having promoting activity of production of neuro growth factor by aerobically culturing a specific fungus belonging to the genus *Penicillium*, capable of producing a tripeptide under a stationary condition, collecting a product and pharmaceutically manufacturing.

CONSTITUTION: A fungus (e.g. *Penicillium fellutanum* SCRC-f25 (FERM P-12,385) belonging to the genus *Penicillium*, capable of producing a tripeptide of the formula is inoculated into a medium, subjected to stationary culture at 25°C for 11 days, the culture solution is filtered by tripled gauze and separated into mycelia and a supernatant liquid. The mycelia are cut with scissors into small fragments, which are shaken and extracted in methanol at room temperature for 3 hours and filtered. The solvent is distilled away from the filtrate under reduced pressure, the residue is redissolved in 90% methanol, extracted with n-hexane, the hexane layer is removed, the methanol layer is subjected to reversed phase column chromatography, purified to give the tripeptide of the formula. The tripeptide as an active ingredient is pharmaceutically manufactured with a medicine carrier to give the objective promoter for production of neuro growth factor.

**(54) ANTI-HUMAN PIVKA-II ANTIBODY, HYBRIDOMA AND METHOD FOR IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT**

(11) 5-284994 (A) (43) 2.11.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-118400 (22) 10.4.1992
 (71) IATRON LAB INC (72) YOSHIO JO(1)
 (51) Int. Cl.⁵. C12P21/08, C12N5/20, G01N33/577//C12N15/06

PURPOSE: To obtain a new monoclonal antibody useful for immunological determination of human PIVKA-II.

CONSTITUTION: A monoclonal antibody (immunoglobulin class is IgG) specifically reacting with human PIVKA-II but not human prothrombin and human thrombin. The monoclonal antibody is obtained by culturing a hybridoma of mammalian spleen cells immunized against artificial human PIVKA-II prepared by decarboxylating human prothrombin and mammalian myeloma cells.

(54) METHOD FOR MEASURING AMOUNT OF POLLEN AND COMPOSITION THEREFOR

(11) 5-284995 (A) (43) 2.11.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-116870 (22) 9.4.1992
 (71) EKUOSU RES K.K. (72) MASAHIRO SUZUKI(2)
 (51) Int. Cl.⁵. C12Q1/28//G01N21/78

PURPOSE: To measure an amount of pollen more accurately and simply than a conventional pollen sensor and to obtain a composition therefor.

CONSTITUTION: A method for measuring an amount of pollen consists of a process for taking out cytoplasm of pollen, a process for forming water and a coloring matter from hydrogen peroxide and a color primary body by action of peroxidase in the cytoplasm and a process for measuring the formed coloring matter. A composition for measuring the amount of pollen consists of a reagent for taking out the cytoplasm of pollen, hydrogen peroxide and a color primary body in a medium.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-284994

(43)公開日 平成5年(1993)11月2日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
C 1 2 N 5/20				
G 0 1 N 33/577	B	9015-2 J		
		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	C

審査請求 未請求 請求項の数7(全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-118400

(22)出願日 平成4年(1992)4月10日

(71)出願人 000138277

株式会社ヤトロ

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

(72)発明者 徐 吉夫

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロ内

(72)発明者 河野 功

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロ内

(74)代理人 弁理士 森田 憲一

(54)【発明の名称】 抗ヒトPIVKA-II抗体、ハイブリドーマおよび免疫学的測定方法

(57)【要約】

【構成】 各々ヒトPIVKA-IIと反応するが、ヒトプロトロンビンおよびヒトトロンビンとは反応しないモノクローナル抗体、ヒトトロンビンおよびヒトプロトロンビンにも反応するモノクローナル抗体、並びにヒトプロトロンビンに反応しヒトトロンビンに反応しないモノクローナル抗体、それらを分泌するハイブリドーマ、並びに前記モノクローナル抗体を用いる免疫学的定量方法。

【効果】 前記モノクローナル抗体の2種以上の組み合わせにより、血漿試料中のPIVKA-IIを、希釈工程を必要とせず、迅速かつ正確に、しかも試料中のプロトロンビンの妨害を受けずに特異的に測定できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトPIVKA-IIと特異的に反応し、ヒトプロトロンビンおよびヒトトロンビンとは反応しないモノクローナル抗体。

【請求項2】 ヒトプロトロンビンを脱炭酸して調製した人工的ヒトPIVKA-IIで免疫した哺乳動物の脾臓と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によって形成され、請求項1記載のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマまたはそれに由来する細胞株。

【請求項3】 ヒトPIVKA-II、ヒトトロンビンおよびヒトプロトロンビンに反応するモノクローナル抗体。

【請求項4】 ヒトプロトロンビンを脱炭酸して調製した人工的ヒトPIVKA-IIで免疫した哺乳動物の脾臓と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によって形成され、請求項3記載のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマまたはそれに由来する細胞株。

【請求項5】 ヒトPIVKA-IIおよびヒトプロトロンビンに特異的に反応し、ヒトトロンビンには反応しないモノクローナル抗体。

【請求項6】 ヒトプロトロンビンを脱炭酸して調製した人工的ヒトPIVKA-IIで免疫した哺乳動物の脾臓と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によって形成され、請求項5記載のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマまたはそれに由来する細胞株。

【請求項7】 不溶性担体に固定化された、請求項3記載のモノクローナル抗体または請求項5記載のモノクローナル抗体の少なくとも1種および請求項1記載のモノクローナル抗体と、被検試料とを接触させ、被検試料における凝集反応を観察することを特徴とする、ヒトPIVKA-IIの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒトPIVKA-II (Protein induced by vitamin K absence-II) に対して反応性を有する各種のモノクローナル抗体群、それらのモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ群およびそれらのモノクローナル抗体群を用いたヒトPIVKA-IIの免疫学的定量方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 プロトロンビンは血液凝固II因子とも呼ばれる糖タンパク質であり、そのアミノ末端近傍に10個のγ-カルボキシグルタミン酸残基（以下G1aという）を有する。肝細胞癌などによる肝実質細胞障害、ビタミンKの欠乏、ビタミンK拮抗剤の投与などがあると、このプロトロンビンの10個のG1aの一部あるいは大部分は、カルボキシ化が不完全なグルタミン酸残基（以下G1uという）のままで血中に遊離してくる。この糖タンパク質を異常プロトロンビンすなわちPIVKA-IIと呼んでいる。近年、肝細胞癌患者において高

率にPIVKA-IIが発現され、健康人に比較して血漿中に高濃度に出現することが報告されており、肝細胞癌の新しい腫瘍マーカーあるいは診断のモニターのためのマーカーとして重要視されている。そのため、血液あるいは血漿中のPIVKA-IIの量を正確かつ簡便に測定する必要がある。

【0003】 従来から知られているPIVKA-IIの代表的な測定方法としては、以下の4種類の方法を挙げることができる。第1の方法は、二次元交叉免疫電気泳動法を用いる方法である。第2の方法は、PIVKA-IIに特異的なポリクローナル抗体を用いた競合的放射免疫測定法である。第3の方法は、硫酸バリウムで混在するプロトロンビンを吸着、除去し、PIVKA-IIをラテックスを用いた間接凝集法で測定する。第4の方法は、PIVKA-IIを特異的に認識するモノクローナル抗体とプロトロンビンに対するポリクローナル抗体の両者を用い、その一方を固定化抗体とし、酵素標識抗体として測定する酵素免疫測定法である。

【0004】 しかしながら、第1の方法は感度が低く定量性に欠けるという欠点があった。第2の方法は、放射性同位元素を用いるという施設上の問題、およびPIVKA-IIに特異的なポリクローナル抗体の精製が煩雑であり、ロット差があるという種々の問題点がある。第3の方法では、間接凝集法に用いる抗体がプロトロンビンに対するポリクローナル抗体であるため、PIVKA-IIを特異的に測定できない欠点がある。第4の方法では、モノクローナル抗体を使用するので、特異性に優れた抗体を安定に供給できる点で第1および第2の方法の欠点が改良されているものの、酵素免疫反応が有する欠点、すなわち操作が煩雑で測定に長時間を要するという問題点を解消するものではなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者は、PIVKA-IIを簡便、正確かつ再現性よく測定する方法を開発するべく鋭意研究をした結果、ヒトPIVKA-IIに特異的に反応性を示すが、ヒトプロトロンビンには反応しない第1のモノクローナル抗体群（GLA-1、GLA-2）、ヒトトロンビンおよびヒトプロトロンビンの両者に反応性を示す第2のモノクローナル抗体群（T-1、T-2）、ヒトプロトロンビンに反応を示すが、ヒトトロンビンには反応しない第3のモノクローナル抗体群（PT-1、PT-2）の3種類のモノクローナル抗体群を見だし、これらのモノクローナル抗体群の第1のモノクローナル抗体群と第2あるいは第3のモノクローナル抗体群の2種類、第1と第2と第3のモノクローナル抗体群の3種類の組み合わせを用いると、血漿中のPIVKA-IIを迅速かつ正確に、B/F分離を必要とせず、しかも検体中にPIVKA-IIに比べて大量に存在するプロトロンビンの妨害を受けずに、特異的に測定することができることを見いだした。従って、本発明の

目的は、前記の新規モノクローナル抗体、そのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、およびそのモノクローナル抗体を用いる免疫学的定量方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、

(1) ヒトPIVKA-IIと特異的に反応し、ヒトプロトロンビンおよびヒトトロンビンとは反応しないモノクローナル抗体、(2) ヒトPIVKA-II、ヒトトロンビンおよびヒトプロトロンビンに反応するモノクローナル抗体、および、(3) ヒトPIVKA-IIおよびヒトプロトロンビンに特異的に反応し、ヒトトロンビンには反応しないモノクローナル抗体に関する。また、本発明は、ヒトプロトロンビンを脱炭酸して調製した人工的ヒトPIVKA-IIで免疫した哺乳動物の脾臓と哺乳動物のミエローマ細胞との融合によって形成され、前記の各モノクローナル抗体(1)、(2)または(3)を分泌する各ハイブリドーマまたはそれに由来する細胞株にも関する。更に、本発明は不溶性担体に固定化された、前記モノクローナル抗体(2)または前記モノクローナル抗体(3)の少なくとも1種および前記モノクローナル抗体(1)と、被検試料とを接触させ、被検試料における凝集反応を観察することの特徴とする、ヒトPIVKA-IIの測定方法にも関する。

【0007】以下、本発明をモノクローナル抗体、ハイブリドーマおよび免疫学的測定方法の順に説明する。免疫源として用いる人工的PIVKA-IIは、例えばP. A. Priceの方法(J. Biol. Chem. 254, 431, 1979)に従って調製することができる。次に、精製した人工PIVKA-II免疫原溶液を用いて哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギまたはウマ)をイン・ビボ免疫法により免疫する。

【0008】具体的には、例えば、精製した人工PIVKA-II免疫原溶液を等量のプロイド氏完全アジュバントまたは不完全アジュバントと乳化するまで混合する。この混合液を、例えばマウスの皮下に投与する(第1回免疫)。以後、2~4週間の間隔で同様の操作を行い、数回免疫する。最終免疫から数日後に脾臓を無菌的に取り出し、ステンレスメッシュなどで押しつぶして脾臓細胞を調製し、細胞融合工程に用いる。

【0009】細胞融合に用いるもう一方の親細胞であるミエローマ細胞(骨髓腫細胞)としては、各種の公知の細胞株、例えば、p3(p3/×63-Ag8)[Nature, 256, 495-497(1975)]、p3-U1[Current Topics in Microbiology and Immunology, 81; 1-7(1978)]、NS-1[Eur. J. Immunol., 6; 511-519(1976)]、MPC-11[Cell, 8; 405-415(1976)]、SP2/0[Nature, 276;

269-270(1978)]、FO[J. Immunol. Meth., 35; 1-21(1980)]、×63.6.55.3[J. Immunol., 123; 1548-1550(1979)]、S194[J. Exp. Med., 148; 313-323(1978)]、またはラットにおけるR210[Nature, 277; 131-133(1979)]などを使用することができる。

【0010】免疫脾臓細胞とミエローマ細胞との細胞融合は通常の方法で行うことができ、例えば、公知の融合促進剤(ポリエチレングリコールまたはセンダイウイルスなど)を用い、場合により補助剤(ジメチルスルホキシドなど)を用いることもできる。免疫脾臓細胞とミエローマ細胞との使用比率も常法と同様でよく、例えば、ミエローマ細胞に対して脾臓細胞を約1~10倍程度の量で用いる。融合用培地としては、例えば、40%(w/v)ポリエチレングリコールを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)を用いることができる。融合は、前記の培地内で免疫脾臓細胞とミエローマ細胞とをよく混合することによって行う。続いて、選別用培地(例えば、HAT培地)を用いてハイブリドーマ以外の細胞を除去し、ハイブリドーマ培養上清の抗体産生の有無を、例えばELISA法によって測定し、目的とするハイブリドーマを分離する。

【0011】こうして得られた、本発明のモノクローナル抗体(後述)を各々分泌するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することができ、また液体窒素等の中で容易に長期間保存することができる。

【0012】また、前記のハイブリドーマを培養する培地としては、ハイブリドーマの培養に適した任意の培地を用いることができ、好適にはDMEMにウシ胎児血清、L-グルタミン、L-ピルビン酸および抗生物質(ペニシリンGとストレプトマイシン)を含む培地が用いられる。

【0013】前記のハイブリドーマの培養は、イン・ビトロの場合には例えば培地中で5%CO₂濃度および37℃で約3日間、またイン・ビボ例えばマウスの腹腔中で培養する場合には約14日間実施するのが好ましい。

【0014】前記のハイブリドーマを常法によって培養した培養液から、あるいは前記6種のいずれかのハイブリドーマを投与した適当な哺乳動物(例えばマウスまたはラット)の腹水から、目的とするモノクローナル抗体を分離し、精製することが可能である。

【0015】このようにして製造された培養液またはマウスの腹水からモノクローナル抗体を分離、精製する場合にはタンパク質の単離、精製に一般的に用いられる方法を用いることが可能である。そのような方法としては硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインA結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー

一、透析、凍結乾燥の方法等がある。

【0016】こうして得られた本発明のモノクローナル抗体は、その反応性によって以下の3種に分類することができる。

(1) ヒトPIVKA-IIと特異的に反応し、ヒトプロトロンビンとは反応しない第1のモノクローナル抗体群 (例えば、モノクローナル抗体GLA-1およびGLA-2)。

(2) ヒトプロトロンビンおよびヒトプロトロンビンと特異的に反応する第2のモノクローナル抗体群 (例えば、モノクローナル抗体T-1およびT-2)。

(3) ヒトプロトロンビンと特異的に反応し、ヒトプロトロンビンとは反応しない第3のモノクローナル抗体群 (例えば、モノクローナル抗体PT-1およびPT-2)。

【0017】本発明による前記の第1～第3のモノクローナル抗体群を不溶性担体に固定化させ、前記第1のモノクローナル抗体および前記第2および/または前記第3のモノクローナル抗体を被検試料と接触させると、被検試料中のプロトロンビンとは凝集反応を起こさず、PIVKA-IIとの間でのみ凝集反応を起こさせることができるので、PIVKA-IIの免疫学的定量方法に用いることができ、そして免疫学的定量用試薬としても有用である。

【0018】本発明の免疫学的定量方法に用いる被検試料は、PIVKA-IIを含有する可能性のある試料であれば特に制限されるものではないが、例えば、生体試料、特に血液、血漿または尿、好ましくは血漿である。本発明の免疫学的定量方法においては、被検試料を希釈せずに、そのまま使用しても、被検試料中に遊離の状態が存在するヒトプロトロンビンの妨害を避けることができる。

【0019】不溶性担体としては、抗原抗体の凝集反応を利用する免疫学的測定方法において一般的に用いられる任意の不溶性担体を用いることができ、例えば、ラテックス粒子 (特に、ポリスチレンラテックス粒子) を挙げることができる。

【0020】本発明によるモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化させるには、公知の方法、例えば、化学結合法 (架橋剤としてカルボジイミド、グルタルアルデヒド等を用いる) または物理吸着法を用いることができる。こうして、モノクローナル抗体と不溶性担体との複合体を形成し、これを本発明の免疫学的定量方法に用いることができる。

【0021】本発明の免疫学的定量方法においては、前記の不溶性担体に固定化した少なくとも2種のモノクローナル抗体を使用する (前記第1のモノクローナル抗体は必須である) が、或る1種のモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化して調製した複合体を2種または3種用いるか、あるいは、2種または3種のモノクローナル抗体を或る1種の不溶性担体に固定化して調製した複合

体を用いることができる。更に、或る1種のモノクローナル抗体を不溶性担体に固定化して調製した複合体1種と、2種のモノクローナル抗体を或る1種の不溶性担体に固定化して調製した複合体1種との組み合わせを用いることもできる。本発明のモノクローナル抗体2種の組み合わせとしては、前記の第1のモノクローナル抗体 (GLA-1、GLA-2) と第2のモノクローナル抗体 (T-1、T-2) との組み合わせが好ましい。

【0022】本発明の測定方法においては、前記のモノクローナル抗体固定化不溶性担体複合体の既知一定量と未知量のPIVKA-IIを含有する水性被検試料の一定量とを適当な反応容器 (例えば、スライド板上あるいは反応セル) 中で接触させる。例えば血漿試料の場合には、血漿試料 (非希釈液) 1容量部に対して前記の複合体懸濁水 (1%以上の濃度) を1～3容量部加えて接触させる。また、凝集像をより鮮明にするために、試料と複合体懸濁水に更に緩衝液 (例えば、トリス塩酸緩衝液) を加えて接触させてもよい。こうして形成される凝集の程度からPIVKA-II濃度の定量を行うことができる。この凝集反応は、血漿試料中に存在する遊離のプロトロンビンの妨害を受けない。例えば、スライド板上の場合には目視的に、反応セルの場合は特定の波長を用いて分光学的に凝集反応を測定し、被検試料中のPIVKA-II濃度を定量することができる。

【0023】

【実施例】次に、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

実施例1：人工的PIVKA-IIの調製

(a) 人工的PIVKA-IIの調製は、精製プロトロンビンよりP. A. Priceの方法 (J. Biol. Chem. 254, 431, 1979) に従って行った。即ち、3mgのヒトプロトロンビンを0.05M塩酸および0.1M NH_4HCO_3 に溶解し、凍結乾燥した。減圧下で乾燥プロトロンビンを110℃で加熱し、その後セファデックスG-100によるゲルクロマトグラフィーにより (4℃) 精製した。

【0024】(b) 免疫化脾臓細胞の調製

人工PIVKA-II免疫原溶液 (A280nm=0.1)

1) を等量のプロインド氏完全アジュバントと乳化するまで混合し、その混合液200 μ lをBALB/c系マウスの腹腔内に投与することにより免疫を行った (第1回免疫)。30日経過後、前記と同様の混合液200 μ lを前記のマウスの腹腔内に投与した (第2回免疫)。第2回免疫から21日経過後、人工PIVKA-II免疫原溶液 (A280nm=0.1) を等量の生理食塩水で希釈して調製した人工PIVKA-II希釈液200 μ lを、前記のマウスの静脈内に投与した (最終免疫)。最終免疫から3日経過後、脾臓を無菌的にマウスから取り出し、次の細胞融合工程に使用した。

【0025】(c) 細胞融合

15%ウシ胎児血清を含むDME培地5mlを入れたシャーレに、無菌的に抽出した前記の脾臓を入れた。次に、15%ウシ胎児血清を含むDME培地約15mlで前記脾臓を還流して脾臓細胞を流出させた後、この脾臓細胞懸濁液をナイロンメッシュに通した。この脾臓細胞を50ml遠心チューブに集め、500×gで10分間遠心した。こうして得たペレットにヘモライジング溶液(155mM-NH₄Cl、10mM-KHCO₃、1mM-Na₂EDTA:pH7.0)4mlを加え、懸濁させた。0℃で5分間放置して懸濁液中の赤血球を破壊させた。15%ウシ胎児血清10mlを含むDME培地を加えてから遠心分離した。こうして得たペレットをDME培地で遠心法により洗浄し、生きている脾臓細胞数を測定した。

【0026】一方、予め培養しておいたマウスミエロマ細胞(骨髓腫細胞)SP2/0-Ag14(理化学研究所ジーンバンク細胞銀行)約2×10⁷個に前記脾臓細胞1×10⁸個を加え、DME培地中でよく混合し、遠心分離を行った(500×g、10分間)。その上清を吸引し、ペレットをよく解きほぐし、40%ポリエチレングリコール4000溶液(38℃に保温)0.5mlを滴下し、遠心チューブを手で1分間穏やかに回転することによってポリエチレングリコール溶液と細胞ペレットとを混合させた。次に、38℃に保温しておいたDME培地を30秒毎に1mlずつ加えて、チューブを穏やかに回転させた。この操作を10回繰り返した後、15%ウシ胎児血清20mlを含むDME培地を加えて、遠心分離(500×g、10分間)を行った。上清を除去した後、15%ウシ胎児血清を含むHAT培地(DME培地にアミノプテリン4×10⁻⁷M、チミジン1.6×10⁻⁵M、ヒポキサンチン1×10⁻⁴Mになるように添加したもの)で細胞ペレットを遠心法によって2回洗浄した後、前記HAT培地40mlに懸濁した。この細胞懸濁液を96ウェル細胞培養プレートの各ウェルに200μlずつ分注し、5%炭酸ガスを含む炭酸ガス培養器で37℃にて培養を開始した。培養中、2~3日間隔で各ウェルの培地を約100μl除き、新たに前記のHAT培地100μlを加えることによりHAT培地中で増殖するハイブリドーマを選択した。8日目から15%ウシ胎児血清を含むHAT培地(DME培地にチミジン1.6×10⁻⁵M、ヒポキサンチン1×10⁻⁴Mになるように添加したもの)に交換し、ハイブリドーマを観察するとともに、10日目に、後記のELISA法により、抗人工PIVKA-II抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。

【0027】(d) ハイブリドーマの樹立

ハイブリドーマ培養液の上清における産生抗体の有無はELISA法により測定した。96ウェルELISA用プレート(Immulon1.1、日本ダイナテック株式

会社)の各ウェルに前記の人工PIVKA-II免疫原溶液(A280nm=0.05、生理食塩水で希釈した)50μlずつを分注し、25℃で2時間放置した。次に、0.05%Tween20-生理食塩水で3回洗浄した後、各ウェルに培養液上清50μlを加え、25℃で1時間反応させた。

【0028】次に、Tween20-生理食塩水で200倍に希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウス抗体(ダコ社、デンマーク)50μlを各ウェルに加えた。反応終了後、0.05%Tween20-生理食塩水で各ウェルを3回洗浄し、0.5mMアミノアンチピリン、10mMフェノールおよび0.005%過酸化水素水を含む溶液250μlを各ウェルに加え、25℃で30分間反応させ、各ウェルの490nmにおける吸光度を測定した。その結果、192ウェル中、6ウェルに抗体産生が認められた。その6ウェル中のハイブリドーマを24ウェルプレートに移し、15%ウシ胎児血清を含むHAT培地で4~5日間培養した。その後、再度ELISA法によって抗人工PIVKA-II抗体の産生の有無を確認してから限界希釈法によりクロニングした。限界希釈法は、HT培地でハイブリドーマが5個/mlとなるように希釈した細胞浮遊液を、予め正常BALB/c系マウスの腹腔細胞がウェルあたり2×10⁴個分注してある96ウェルプレートの各ウェルに100μlずつ分注した。10日後、ELISA法によって人工PIVKA-II特異的抗体を産生するハイブリドーマのクローンをスクリーニングした。

【0029】その結果、各ハイブリドーマにつき、20~40個の抗体産生クローンが得られた。これらのクローンの中から、増殖力が強く、抗体分泌能が高く、しかも安定なクローンを選び、前記と同様の方法で再クローン化を行い、6種の抗人工PIVKA-II抗体産生ハイブリドーマGLA-1、GLA-2、T-1、T-2、およびPT-1、PT-2を樹立した。これら6種のハイブリドーマから分泌される6種のモノクローナル抗体GLA-1、GLA-2、T-1、T-2、およびPT-1、PT-2とヒトプロトンビンあるいはヒトロンビン(アテンズ・リサーチ社、アメリカ)との反応性を、96ウェルELISA用プレートにヒトプロトンビンあるいはヒトプロトンビンを被覆し、前記のELISA法と同様の方法により調べた。モノクローナル抗体GLA-1、GLA-2はヒトプロトンビンとヒトプロトンビンの両者とは反応しなかった。モノクローナル抗体T-1、T-2はヒトプロトンビンとヒトプロトンビンの両者と反応した。一方モノクローナル抗体PT-1、PT-2はヒトプロトンビンに反応したが、ヒトプロトンビンには反応しなかった。

【0030】実施例2:モノクローナル抗体の製造

(a) イン・ビトロ法

マウスハイブリドーマGLA-1、GLA-2、T-

1、T-2、およびPT-1、PT-2を、それぞれ15%ウシ胎児血清を含むDME培地で、37℃で5%二酸化炭素雰囲気中において72~96時間培養した。培養物を遠心分離(10000×g、10分間)後、上清に固形の硫酸アンモニウムを50%最終濃度となるように徐々に加えた。混合物を氷冷下で30分間攪拌した後、60分間放置してから遠心分離(10000×g、10分間)処理し、得られた沈渣を少量の10mMリン酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、1000倍量の10mMリン酸緩衝液ですでに平衡化したDEAE-セルロースのカラムに充填した。モノクローナル抗体の溶出は10mMリン酸緩衝液(pH8.0)と0.2M-NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH8.0)の間で濃度勾配法により行った。溶出されたモノクローナル抗体を限外濾過法で濃縮し、0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)に対して透析した。ウシ血清IgGを除くために、透析物をヤギ抗ウシ血清IgG-セファロース4Bカラムに通した。次に、通過液を0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化したプロテインA-セファロース4Bカラムに充填した。カラムをpH3.5の緩衝液で溶出して、精製した抗ヒトPIVKA-II特異モノクローナル抗体GLA-1、同様にモノクローナル抗体GLA-2、モノクローナル抗体T-1、モノクローナル抗体T-2、モノクローナル抗体PT-1、およびモノ*

*モノクローナル抗体PT-2の溶液を得た。

【0031】(b) イン・ビボ法

プリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) 0.5mlを10~12週齢のBALB/c系マウスの腹腔内に投与し、それから14~20日目のマウスの腹腔内にインビトロで増殖されたハイブリドーマGLA-1、GLA-2、T-1、T-2、PT-1、またはPT-2をマウス一匹あたり 2×10^6 個となるように接種した。

10 【0032】各ハイブリドーマにつき一匹のマウスから約10~15mlの腹水が得られた。その抗体濃度は、2~10mg/mlであった。腹水中のモノクローナル抗体の精製は、前記のイン・ビトロ精製と同様の方法(但し、ヤギ抗ウシ血清IgG-セファロース4Bのカラムを通す操作を除く)で行った。

【0033】実施例3：モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスおよび特異性の同定

モノクローナル抗体GLA-1、GLA-2、T-1、T-2、PT-1、またはPT-2の免疫グロブリンクラスおよび特異性の同定はそれぞれオクテロニー免疫拡散法およびエンザイムイムノアッセイ法により行った。結果は表1および表2に示す通りである。

【0034】

【表1】

モノクローナル抗体	免疫グロブリンクラス	プロトロンビンとの反応性	フルトロンビン1との反応性	トロンビンとの反応性	フラグメント1との反応性
GLA-1	IgG	-	-	-	-
GLA-2	IgG	-	-	-	-
T-1	IgG	+	+	+	-
T-2	IgG	+	+	+	-
PT-1	IgG	+	+	+	+
PT-2	IgG	+	+	+	-

【0035】

【表2】

モノクローナル抗体	フラグメント2との反応性	グラ領域との反応性(1~42)	ペプチドIとの反応性	ペプチドIIとの反応性
GLA-1	-	-	+	-
GLA-2	-	-	-	+
T-1	-	-	-	-
T-2	-	-	-	-
PT-1	-	-	-	-
PT-2	+	-	-	-

【0036】表1および表2において+はELISA法で反応を示すことを、そして-はELISA法で反応を示さないことを意味する。また、図1に示すとおり、プレトロンビンの1~582番目のアミノ酸配列において、プレトロンビン1は158~582番目、フラグメント1は1~157番目、フラグメント2は158~275番目、グラ領域は1~41番目、ペプチドIは1~24番目(但し、g1aをg1uに置換した合成ペプチド)およびペプチドIIは25~41番目(但し、g1aをg1uに置換した合成ペプチド)である。

【0037】実施例4:抗体と不溶性担体(ラテックス)との結合

モノクローナル抗体GLA-1(2.0mg/ml)を含有する水溶液2mlと、ラテックス溶液(2%、Dow Chemical社:粒径0.482μm)2mlとを混合し、約1時間攪拌した。遠心(20000×g、10分間)した後、沈澱を0.1%BSA溶液に懸濁し、約1時間攪拌した。再び遠心(20000×g、10分間)した後、沈澱を水に懸濁し、約2時間攪拌した。こうして、モノクローナル抗体GLA-1/ラテックス複合体含有液を得た。同様にモノクローナル抗体GLA-2、モノクローナル抗体T-1、モノクローナル抗体T-2、モノクローナル抗体PT-1およびモノクローナル抗体PT-2を用いて、単独の各モノクローナル抗体とラテックスとの複合体の含有液を調製した。

【0038】抗体混合物とラテックスとの複合体は以下のように調製した。モノクローナル抗体GLA-1、モノクローナル抗体T-1およびモノクローナル抗体PT-1をそれぞれ0.66mg/mlずつ含有する水溶液2mlと、ラテックス溶液(2%、Dow Chemi *

*cal社:粒径0.482μm)2mlとを混合し、約1時間攪拌した。以下、前記と同様に処理して、モノクローナル抗体GLA-1/モノクローナル抗体T-1/モノクローナル抗体PT-1/ラテックス複合体を調製した。他の組み合わせも同様の方法で調製した。

【0039】モノクローナル抗体GLA-1およびモノクローナル抗体T-1をそれぞれ1mg/mlずつ含有する水溶液とラテックス溶液とを等量混合すること以外は前記と同様に、モノクローナル抗体GLA-1/モノクローナル抗体T-1/ラテックス複合体を調製した。

【0040】実施例5:スライド凝集反応による定量
実施例4で調製した抗体ラテックス複合体含有液30μlと種々な濃度のPIVKA-IIを含有する水溶液30μlとをスライドガラス上で混合し、揺動して3分後に凝集像を目視的に判定した。結果を以下の表3~表6に示す。

【0041】表3~表6において、+は凝集ありを、そして-は凝集なしを各々意味する。また、各表の抗体/ラテックス複合体の欄において、複合体の種類をその複合体に結合するモノクローナル抗体によって示す。従って、例えばGLA-1はモノクローナル抗体GLA-1/ラテックス複合体を意味し、GLA-1+T-1はモノクローナル抗体GLA-1/ラテックス複合体とモノクローナル抗体T-1/ラテックス複合体との等量混合液を意味する。更に、GLA-1/T-1はモノクローナル抗体GLA-1含有液、モノクローナル抗体T-1含有液およびラテックス溶液を等量混合したものである。

【0042】

【表3】

モノクローナル抗体 /ラテックス複合体 の種類	P I V K A - II濃度 ($\mu g/ml$)					
	102.4 ~204.8	51.2 ~102.4	25.6 ~51.2	12.8 ~25.6	6.4 ~12.8	3.2 ~6.4
GLA-1	—	—	—	—	—	—
GLA-2	—	—	—	—	—	—
T-1	—	—	—	—	—	—
T-2	—	—	—	—	—	—
PT-1	—	—	—	—	—	—
PT-2	—	—	—	—	—	—
GLA-1 + T-1	+	+	+	+	+	+
GLA-1 + T-2	+	+	+	+	+	+
GLA-1 + PT-1	+	+	+	+	—	—
GLA-1 + PT-2	+	+	+	+	+	+
GLA-2 + T-1	+	+	+	+	+	+
GLA-2 + T-2	+	+	+	+	+	+
GLA-2 + PT-1	+	+	+	—	—	—
GLA-2 + PT-2	+	+	+	+	—	—
GLA-1 + T-1 + PT-1	+	+	+	+	+	+
GLA-1 + T-1 + PT-2	+	+	+	+	+	+
GLA-2 + T-1 + PT-1	+	+	+	+	+	+
GLA-2 + T-1 + PT-2	+	+	+	+	+	+
GLA-1 + T-2 + PT-1	+	+	+	+	+	+
GLA-1 + T-2 + PT-2	+	+	+	+	+	+

【0043】

【表4】

モノクローナル抗体 /ラックス複合体 の種類	PIVKA-II濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	102.4 ~204.8	51.2 ~102.4	25.6 ~51.2	12.8 ~25.6	6.4 ~12.8	3.2 ~6.4
GLA-1 / T-1	+	+	+	+	+	+
GLA-1 / T-2	+	+	+	+	+	+
GLA-1 / PT-1	+	+	+	+	-	-
GLA-1 / PT-2	+	+	+	+	+	+
GLA-2 / T-1	+	+	+	+	+	+
GLA-2 / T-2	+	+	+	+	+	+
GLA-2 / PT-1	+	+	+	-	-	-
GLA-2 / PT-2	+	+	+	+	-	-
GLA-1 / T-1 / PT-1	+	+	+	+	+	+
GLA-1 / T-1 / PT-2	+	+	+	+	+	+
GLA-2 / T-1 / PT-1	+	+	+	+	+	+
GLA-2 / T-1 / PT-2	+	+	+	+	+	+
GLA-1 / T-2 / PT-1	+	+	+	+	+	+
GLA-1 / T-2 / PT-2	+	+	+	+	+	+

【0044】

【表5】

モノクローナル抗体 /ラテックス複合体 の種類	P I V K A - II 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	1.6 ~3.2	0.8 ~1.6	0.4 ~0.8	0.2 ~0.4	0.1 ~0.2	0.05 ~0.1
GLA-1	-	-	-	-	-	-
GLA-2	-	-	-	-	-	-
T-1	-	-	-	-	-	-
T-2	-	-	-	-	-	-
PT-1	-	-	-	-	-	-
PT-2	-	-	-	-	-	-
GLA-1 + T-1	+	+	+	+	+	-
GLA-1 + T-2	+	+	+	+	+	-
GLA-1 + PT-1	-	-	-	-	-	-
GLA-1 + PT-2	-	-	-	-	-	-
GLA-2 + T-1	+	+	+	+	+	-
GLA-2 + T-2	+	+	+	+	-	-
GLA-2 + PT-1	-	-	-	-	-	-
GLA-2 + PT-2	-	-	-	-	-	-
GLA-1 + T-1 + PT-1	+	+	-	-	-	-
GLA-1 + T-1 + PT-2	+	+	+	-	-	-
GLA-2 + T-1 + PT-1	+	+	-	-	-	-
GLA-2 + T-1 + PT-2	+	-	-	-	-	-
GLA-1 + T-2 + PT-1	+	+	-	-	-	-
GLA-1 + T-2 + PT-2	+	-	-	-	-	-

【0045】

【表6】

モノクローナル抗体 /ラテックス複合体 の種類	PIVKA-II濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	1.6 ~3.2	0.8 ~1.6	0.4 ~0.8	0.2 ~0.4	0.1 ~0.2	0.05 ~0.1
GLA-1 / T-1	+	+	+	+	+	-
GLA-1 / T-2	+	+	+	+	+	-
GLA-1 / PT-1	-	-	-	-	-	-
GLA-1 / PT-2	-	-	-	-	-	-
GLA-2 / T-1	+	+	+	+	+	-
GLA-2 / T-2	+	+	+	+	-	-
GLA-2 / PT-1	-	-	-	-	-	-
GLA-2 / PT-2	-	-	-	-	-	-
GLA-1 / T-1 / PT-1	+	+	-	-	-	-
GLA-1 / T-1 / PT-2	+	+	+	-	-	-
GLA-2 / T-1 / PT-1	+	+	-	-	-	-
GLA-2 / T-1 / PT-2	+	-	-	-	-	-
GLA-1 / T-2 / PT-1	+	+	-	-	-	-
GLA-1 / T-2 / PT-2	+	-	-	-	-	-

【0046】実施例6：精製PIVKA-IIの添加回収試験

5種の検体、即ち健常人Aから採取した血漿（検体1）、健常人Bから採取した血漿（検体2）、肝細胞癌患者Cから採取した血漿（検体3）、肝細胞癌患者Dから採取した血漿（検体4）および肝細胞癌患者Eから採取した血漿（検体5）中のPIVKA-II濃度を、実施例5のモノクローナル抗体GLA-1/モノクローナル*40

*抗体T-1/ラテックス複合体溶液を用いて測定した。次いで、それぞれの検体に精製PIVKA-IIを表7に記載の量で添加し添加回収試験を行った。測定値は検体を倍々希釈して凝集の消失する希釈倍率から半定量的に測定した。結果は表7に示すように、良好な回収が得られた。

【0047】

【表7】

検 体	PIVKA-II量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PIVKA-II添加量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	添加後の測定値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	< 0.1	0.2 0.4 0.8	0.2 - 0.4 0.4 - 0.8 0.8 - 1.6
2	< 0.1	0.2 0.4 0.8	0.2 - 0.4 0.4 - 0.8 0.8 - 1.6
3	0.2 - 0.4	0.8 1.6 3.2	0.8 - 1.6 1.6 - 3.2 3.2 - 6.4
4	1.6 - 3.2	3.2 6.4 12.8	3.2 - 6.4 6.4 - 12.8 12.8 - 25.6
5	6.4 - 12.8	6.4 12.8 25.6	6.4 - 12.8 12.8 - 25.6 25.6 - 51.2

【0048】実施例7：健常人と肝細胞癌患者群のPIVKA-II値

実施例6で使用したモノクローナル抗体GLA-1/モノクローナル抗体T-1/ラテックス複合体溶液を用いて、健常人血漿20検体、肝細胞癌患者血漿55検体のPIVKA-II量を測定した。結果を第2図に示す。健常人群のPIVKA-II量は全例 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満であった。それに対して肝細胞癌患者群は全例 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった。

【0049】

【発明の効果】本発明によれば、血漿試料の希釈操作を行わなくても、血漿中のプロトロンビンの干渉を受けることなく、患者血漿中のPIVKA-II量を特異的に、*

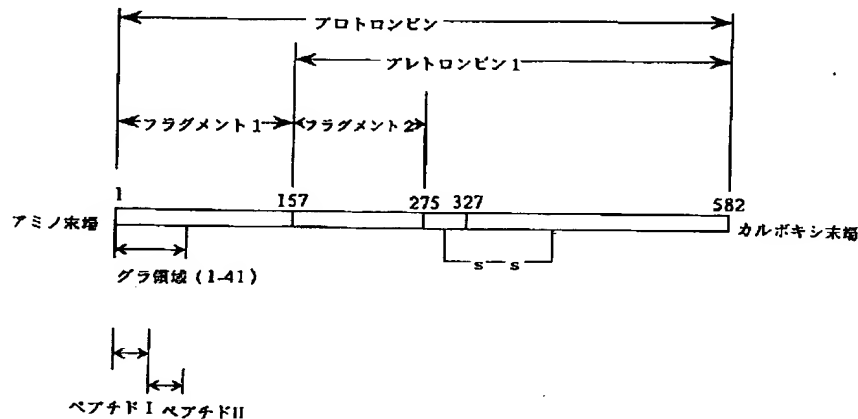
*簡便かつ迅速に、凝集法により測定することができる。これは、本発明によって初めて可能になったものである。従って、本発明は肝細胞癌等の診断および病理研究に有用な手段を提供するものである。

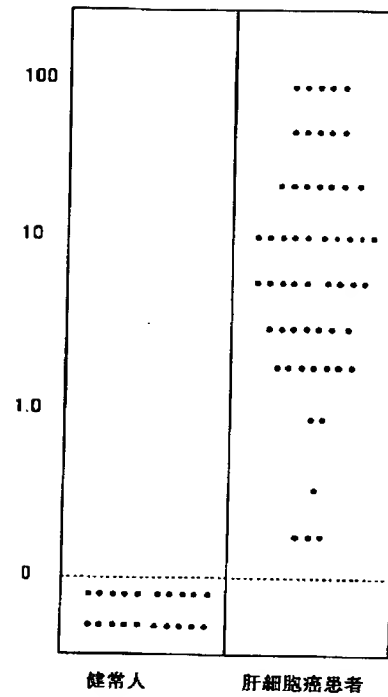
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による各モノクローナル抗体の反応特異性を同定した際に用いた各種のペプチド断片の構造を示す説明図である。

【図2】本発明のモノクローナル抗体ラテックス複合体を用いて、健常人血漿（20検体）および肝細胞癌患者血漿（55検体）中のPIVKA-II量を測定した結果を示す説明図である。

【図1】



PIVKA-II
($\mu\text{g/ml}$)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵
// C 1 2 N 15/06

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所